



دانشگاه علوم پزشکی  
و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

«مدیریت پژوهشی»

عنوان طرح پژوهشی:

بررسی تاثیرات *In vivo* و *In vitro* سم مار  
*Vipera lebetina* همراه با جداسازی پروتئازهای آن

**Studies on *In vivo* and *In vitro* effects of *Vipera lebetina* venom and determination of its proteases**

مجری طرح :

دکتر رامین سیدیان

سال ۱۳۸۹

## مقدمه :

پس از تصویب این طرح در بهمن ماه سال گذشته هماهنگی با دانشگاه خلیج فارس و نیز آقای دکتر بزی جهت انجام آزمایشات بر روی حیوانات صورت پذیرفت و درخواست خرید مواد اولیه به معاونت محترم پژوهشی داده شد که پس از حدودا شش ماه تمامی مواد به غیر از پروتئین مارکر و دو قلم دیگر خریداری شد. آزمایشات ابتدایی بر روی حیوانات با توجه به امکانات موجود در حیوان خانه صورت پذیرفت و با توجه به مواد آورده شده از کشور کره جنوبی برخی از آزمایشات در آزمایشگاه انجام پذیرفت. با توجه به وقفه شش ماهه و ضمن تشکر از معاونت محترم پژوهشی برخی از آزمایشات پیش بینی شده در طرح اولیه توسط یک گروه الجزایری انجام شده و لذا تصمیم گرفته شد تا کارآیی آنتی ونوم انسیتو رازی در خنثی کردن خواص سلول کشی این زهر مورد بررسی قرار گیرد تا از اعتبار کار تحقیقاتی مزبور کاسته نشود و نیز تست الیزا نیز جهت نشان دادن قدرت خنثی کنندگی سم به کار اضافه شود.

## سپاسگزاری

این طرح با حمایت مالی مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر صورت گرفته است.

همچنین از مدیریت واحد پژوهشی دانشگاه خلیج فارس که آزمایشات مربوط به جداسازی آنزیمها در آن جا صورت پذیرفته نهایت تشکر صورت می پذیرد.

## خلاصه گزارش

هدف از انجام این مطالعه بررسی قدرت هموراژیک سم با تزریق زیر پوستی همراه با توانایی آن در ایجاد ادم در کف پای رت و نیز قدرت میوتوکسیک و بالا بردن میزان آنزیمهای اختصاصی پس از ایجاد اثرات نکروتیک در رت بود. در قسمتی دیگر از این بررسی هدف کنکاش در قدرت خنثی کنندگی موارد یافت شده با سرم ضد مار انستیتو رازی بود. از اهداف بالا موارد اول تا سوم محقق شده و عکسهای لازم گرفته شده است. در قسمتی دیگر از بررسی هدف تعیین میزان پروتئین موجود در ونوم و نیز جدا کردن باند های آن به کمک الکتروفورز و تعیین کیفی آنزیمهای ژلاتیناز و کازئیناز و هیالورونیداز و در آخر فیبرینوژنولیز به همراه تعیین قدرت آنتی ونوم در خنثی سازی آنزیم های فوق در محیط آزمایشگاه بود.

قسمت سوم بررسی که به صورت تکمیلی اضافه شده است بررسی قدرت سیتوتوکسیک سم در محیط سلولی و نیز نقش آنتی ونوم در خنثی سازی اثر فوق می باشد.

از مجموع کارهای آزمایشگاهی موارد اول تا سوم صورت پذیرفته و عکس های آن به پیوست موجود است. در بررسی انجام شده مشخص گردید که سم دارای قابلیت بالای هموراژیک بوده و MHD آن مشخص شد. در ضمن با بررسی نمونه های بافتی قدرت میوتوکسیک سم که با وجود سلول های مرده عضلانی و ارتشاح سلولهای دفاعی بود مشخص گردید.

سم دارای قدرت ادماتوز شدید بود در ضمن در الکتروفورز ۱۵ درصد شش باند بسیار قوی دیده شده و نیز در زیموگرافی وجود آنزیم ژلاتیناز مشخص شد

هدف از انجام بررسی فوق تحقیق در مورد قدرت خنثی کنندگی سرم ضد مار انستیتو رازی بر علیه تاثیرات پاتولوژیک سم مار ویپرا لبتینا در محیط آزمایشگاه و بر روی حیوانات است.

برخی از گزارشات حاکی از آن است که در ایران سالانه حدود ۱۰۰ هزار نفر در ایران دچار مارگزیدگی این تعداد منجر به فوت می شود (۱). بیماری زایی و مرگ و میر ناشی از مار گزیدگی می شوند که ۲۰ درصد از به عوامل متعددی از جمله نوع مار، نحوه گزش، میزان زهر تزریق شده، فصل گزش، وضعیت فیزیولوژیک مار، نوع و نحوه انجام کمکهای اولیه، وضعیت سلامتی، سن و وزن فرد گزیده شده و اقدامات درمانی انجام درد ناشی از فرو بردن مکانیکی دندانهای مار جز اولین علایم بالینی است که ممکن شده بستگی دارد. است توسط درد ناشی از اثر زهر نیز تشدید شود. (۲)

*Vipera lebetina* یکی از سمی ترین مارهای موجود در ایران بوده و وجود آنزیم فسفولیپاز در آن ثابت شده است (۳). خونریزی از محل گزیدگی یکی از علایم واضح درگیری با خزندگانی از قبیل مار می باشد. (۴) مطالعه پروتئازهای وابسته به فلزات در سموم مارها جهت یافتن آنزیمهایی از قبیل ژلاتیناز - کازئینازو غیره در مورد سایر مارها به کاربرده شده (۵) و در این مار خاص در تحقیقات خارجی توانسته اند Nerve Growth Factor را استحصال نمایند. (۶)

در کشور ما اثرات این سم بر ایجاد تاکی کاردی و تاکی پنه بر رت انجام شده است (۷) ولی تحقیق خاصی در مورد تاثیرات هموراژیک و ادماتوز این سم هم چنین وجود پروتئازهای موجود در آن و در نهایت شناسنامه دار کردن آن انجام نشده است (۸).

## مواد و روش ها :

رتهای نژاد آلبینو از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز خریداری شده و بعد از وزن شدن در دانشگاه علوم پزشکی بوشهر تحت آزمایش قرار گرفتند.

ابتدا دوزهای متفاوت (بیست و پنج و پنجاه و هفتاد و پنج میکروگرم سم لیوفیلیزه شده) از انستیتو رازی کرج حل شده در صد میکرولیتر نرمال سالین در ناحیه راست پشتی آن ها در مطالعه پایلوت زده شده و دو ساعت بعد از کشتن رتھا با دستگاه گیوتین بعد از باز کردن پوست میزان خونریزی زیر پوستی اندازه گیری شده و با دوربین دیجیتال عکس برداری شد. جهت گروه کنترل از نرمال سالین با حجم مساوی استفاده شد.

در بررسی دیگر مقادیر گفته شده فوق در ناحیه کف پای راست رتھا به صورت زیر پوستی زده شده و در سمت چپ میزان برابر حجمی از نرمال سالین زده شده و بعد از بیست و چهار ساعت رتھا با گیوتین کشته شده و تفاوت وزن دوپا با هم مقایسه شدند.

از نمونه های پوستی بلافاصله بعد از بیوپسی جهت آماده سازی میکروسکوپ نوری در محلول فیکساتیو ( فرمل ۱۰٪) قرار داده شد و سایر مراحل آماده سازی به روش روتین و استاندارد بخش بافت شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر انجام گرفت بدین ترتیب که برای مطالعه ی میکروسکوپ نوری بعد از تثبیت نمودن با الکل آبگیری، با پارقین قالب گیری و با میکروتوم دوار مقاطع ۳ میکرونی تهیه گردید سپس مقاطع با رنگ آمیزی معمولی رنگ آمیزی شدند. از مقاطع مورد نظر میکروگراف های نوری با استفاده از دوربین دیجیتال (Moicam 2000) ساخت محصول مشترک کمپانی Motic هلند و چین تهیه شد. در انتها تمامی میکروگرافهای نوری در کامپیوتر ذخیره شدند.

در مرحله دیگر بعد از اندازه گیری میزان پروتئین سم مار با کمک روش برادفورد و استفاده از Bovine serum albumin به کمک الکتروفورز ۱۵٪ باندهای پروتئینی جدا و تفکیک شدند. در آزمایشی دیگر با استفاده از ژل حاوی ژلاتین و روش زیموگرافی فعالیت ژلاتیناز این سم مورد بررسی قرار گرفته و از ژل مربوطه عکس برداری شد.